

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2009

課題番号：20249052

研究課題名（和文） シノビオリンを機軸とした関節リウマチの総合的理解

研究課題名（英文） Implication of Synoviolin in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Liver Fibrosis.

研究代表者

中島 利博（NAKAJIMA TOSHIHIRO）

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：90260752

研究成果の概要（和文）：

我々がリウマチ（RA）滑膜細胞より発見し関節症発症の必要十分因子であるシノビオリンの成獣における同分子の生理機能の解析、関節症における分子病態を明らかにするためコンディショナルノックアウトマウスを作製した。出生後に同遺伝子をノックアウトした場合でも致死であり、その過程で線維化・慢性炎症に非常に密接に関与し関連疾患の創薬標的となりうることが示された。さらに我々の有するシノビオリン抑制剤がマウスにおける関節炎モデルに有効であることを証明し、米国のユビキチンに特化した創薬系ベンチャーとの創薬開発プロジェクトへと進展した。

研究成果の概要（英文）：

Rheumatoid arthritis (RA) significantly affects quality of life. We recently cloned synoviolin, a RING-typeE3 ubiquitin ligase implicated in the endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD) pathway. Synoviolin is highly expressed in rheumatoid synovial cells and may be involved in the pathogenesis of RA. Inhibition of synoviolin activity is a potentially useful therapeutic approach for the treatment of RA. We conducted a high-throughput screen of small molecules to find inhibitors of synoviolin autoubiquitination activity. We identified two classes of small molecules, which inhibited synoviolin activity. Moreover, these inhibitors suppressed the proliferation of rheumatoid synovial cells and significantly reduced the severity of disease in a mouse model of RA. Our results suggest that inhibition of synoviolin is a potentially useful approach in the treatment of RA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
2009年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2010年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2011年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
総計	36,500,000	10,950,000	47,450,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：関節リウマチ、線維化、小胞体関連分解、滑膜細胞、シノビオリン、コンディショナルノックアウトマウス、化合物

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (Rheumatoid arthritis; RA) は『慢性炎症』をベースとした『滑膜細胞の増殖異常』『軟骨変性』『骨破壊』『線維化』などの時・空間的に多彩な病態からなることが知られている。我々は『滑膜細胞の増殖異常』に着目し、リウマチ滑膜細胞に強発現する分子として、小胞体関連分解 (Endoplasmic reticulum associated degradation; ERAD) の E3 ユビキチン化酵素「シノビオリン」を発見・命名・知財化した (Amano T et al. Gens Dev 2003, HUGO GenBank ID: AB024690)。さらに、同分子が抗アポトーシス作用を介して RA の病態に深く関与することを世界に先駆けて報告した。シノビオリン遺伝子過剰発現 (Tg) マウスは関節炎を発症し、逆にシノビオリン遺伝子ヘテロマウス ( $\text{syno}^{+/-}$ ) は関節炎モデルに対し抵抗性を示す (Amano T et al. Gens Dev 2003) こと、シノビオリン遺伝子欠損マウス ( $\text{syno}^{-/-}$ ) は、肝細胞でのアポトーシスの亢進により胎生致死となること (Yagishita N et al. J Biol Chem 2005)、RA 滑膜細胞に過剰発現し、ERAD の機能を活性化させ (Hyper-ERAD) 小胞体ストレス誘導性のアポトーシスを抑制することで滑膜細胞増殖を引き起こすこと (Yagishita N et al. Nature Clin Prac Rheum 2008, Yamasaki S et al. Cell cycle 2007, Yagishita N et al. Future Rheumatol 2006, Yamasaki S et al. Int J Mol Med 2006, Amano T et al. Gens Dev 2003)、癌抑制遺伝子 p53 を基質とし、p53 依存的なアポトーシスを制御することを (Yamasaki S et al. EMBO J 2007) 明らかとした。

これらの成果は滑膜細胞を意味する Syno が付いた唯一の遺伝子として世界的に広く知られているのみならず、世界に先駆けて小胞体ストレスが慢性炎症性疾患に関与することを示した。

その上、シノビオリンが他のグループより抗 TNF  $\alpha$  療法の感受性を決定する因子との報告、コラーゲン関節炎のみならず他の関節炎モデルに対するシノビオリンの重要性など報告が相次いだ。

## 2. 研究の目的

1 で示したようにシノビオリンの重要な関与の可能性を示唆するデータが蓄積された。しかしながら、シノビオリンの完全欠損マウスは胎生期において致死であることも明らかとなっていた。したがって、これまで成獣における同分子の生理機能の解析、並びに関節症における分子病態を明らかとすることが不可能であった。そこで、本研究事業により、同分子のコンディショナルノックアウトマウスを作製し、これらの点を明らかにすること

を目的とした。また、すでに high through put screening により得られていたシノビオリンの抑制作用を有する化合物の評価を行うことにより RA をはじめとする慢性炎症性疾患の治療につなげることを目的とした。

## 3. 研究の方法

CAG プロモーター制御下で Cre とエストロゲン受容体 (ER) を発現するトランスジェニックマウス (CAG-CreER (+)) を用いて全身で時期特異的にシノビオリンを欠損させる。CAG-CreER (+) マウスでは、ER の合成リガンドであるタモキシフェンと ER が結合すると CreER タンパク質の核移行が誘導される。核に移行した CreER は 2 つの loxP 配列を認識し、その間にあるシノビオリン遺伝子を切り出すことによりシノビオリンを欠損させることができる。

具体的には、

① シノビオリン floxed ヘテロマウス ( $\text{Syno}^{fl/+}$ ) と CAG-CreER (+) を交配させ、得られた産仔の尾組織を用いて PCR 法により遺伝子型を同定し、CAG-CreER (+) /  $\text{Syno}^{fl/+}$  を得る。

② 次に、CAG-CreER (+) /  $\text{Syno}^{fl/+}$  とシノビオリン floxed ホモマウス ( $\text{Syno}^{fl/fl}$ ) を交配させ、得られた産仔の尾組織を用いて PCR 法により遺伝子型を同定し、CAG-CreER (+) /  $\text{Syno}^{fl/fl}$  を得る。

③ マウスが 8 週齢になった時点で、コーン油で 20 mg/mL に調製したタモキシフェンを 5 mg/40 g body weight 腹腔内投与し、シノビオリン cKO マウスを作製する。なお比較対象としては、シノビオリンを欠損させない CAG-CreER (-) /  $\text{Syno}^{fl/fl}$  を用いる。

④ タモキシフェン投与によりシノビオリンが欠損することを DNA・RNA・タンパク質レベルで検討する。

⑤ 経時的に体重測定、臓器重量測定、血液・生化学的検査および組織標本による病理学的解析を行う。

⑥ コラーゲン関節炎などの病態モデルを試みる。

⑦ すでに得られている古典的ノックアウトマウスとそのマウス胎児由来線維芽細胞などを活用し、シノビオリンの生理活性、化合物の評価を行う。

## 4. 研究成果

シノビオリンが ERAD の中でも膜結合型 (ERAD- $L_M$ ) ではなく可溶化されるべき基質 (ERAD- $L_S$ ) の選択的ユビキチン化の中心的役割を成し、シノビオリンが ERAD- $L_S$  であるコラーゲンの品質管理を介し RA のもう一つの病態である『線維化』にも関与することを明らかとした (図 1)。一方、他のグループよりシノビオリンが RA の新薬である抗

TNF $\alpha$  製剤の感受性決定因子であり、かつ『炎症の慢性化』に重要な IL-17 の分子標的であるとの報告がなされている。

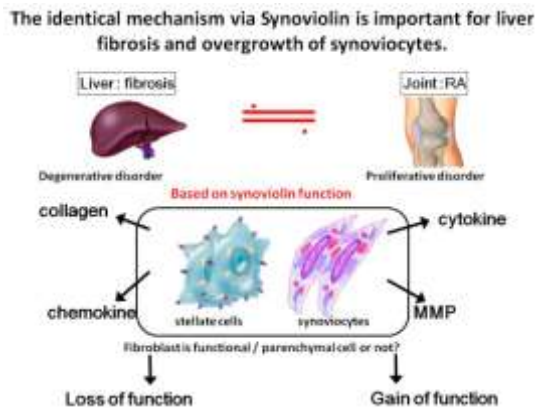


図1 シノビオリンの線維化への関与

これまでの一連の研究成果から RA の病因を考察すると、細胞レベルでは、シノビオリンは可溶性小胞体基質 (ERAD-LS) を選択的にユビキチン化するため、シノビオリンの活性化によって起こる ERAD-LS の分解促進状態が Unfolded Protein Reaction (UPR) を抑制し、翻訳を増加させることで、分泌され得るサイトカイン・プロテアーゼ・細胞外基質などの可溶性蛋白質の分泌増加を引き起こすことが考えられる。次に、組織レベルではその抗アポトーシス作用と炎症性/増殖性サイトカインなどによる滑膜細胞の過増殖が生じる。このプロセスによって、(神経細胞が増殖しないことで不良品蛋白質を蓄積し storage disease が生じるのとは対照的に)、細胞分裂の繰り返しによる希釈効果で 1 細胞あたりの不良品蛋白質が減少し、さらなる増殖と過分泌の方向へと向かい、組織レベルでの自律的悪性ループが形成されることとなる。これらの結果として、生体・個体レベルでは高サイトカイン血症と昨年の Wolffe らにより報告された滑膜細胞自体の関節間の“転移”により、全身性、かつ多関節に種々の免疫応答、プロテアーゼによる組織変性・破壊、細胞外基質の増加による線維化などが生じる。少なくとも、炎症性サイトカイン、線維化シグナルはシノビオリンの発現を誘導することが明らかであるので、最終的には生体レベルでの悪性サイクルを形成し、時空間的多様性と遷延化が生じると考えている。

さらに、2 種類のシノビオリン酵素活性阻害剤 (シノビオリン選択的・非選択的) により RA 発症制御が可能かを検討した。その結果、両化合物は in vitro の系では  $\mu\text{M}$  のオーダーで選択的にシノビオリンの酵素活性を阻害すること、また滑膜細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。

また、これらの化合物が関節炎の発症に対して抑制的な効果を示すかを検討するため、DBA/1 系統のマウスに CIA モデルを適応した。追加免疫時よりこれらの化合物を連日腹腔内投与した結果、II 型コラーゲン抗体の産生はいずれの群でも同等に認められたものの、関節炎の重症度は化合物投与群において有意に抑制されることが明らかとなった。したがってこれらの化合物はシノビオリン阻害剤として有効な薬剤となる可能性が強く示唆された。化合物に関しては米国の企業との共同研究によりさらなる最適化を進めている段階である (<http://www.businesswire.com/news/home/20111023005025/en/Progenra-Tokyo-Medical-University-Form-Rheumatoid-Arthritis>) (図2)。今後、迅速に高齢社会に必要な先進医療の開発に貢献できると考えられ社会的にも多大な還元が期待できる。



図2 米国の企業との共同研究による創薬開発

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 125 件)

- ① Yagishita N, Aratani S, Leach C, Amano T, Yamano Y, Nakatani K, Nishioka K, Nakajima T, RING finger type E3 ubiquitin ligase inhibitors as novel candidates for the treatment of rheumatoid arthritis. Int J Mol Med, in press, 2012, 査読有
- ② Usui C, Hatta K, Aratani S, Yagishita N, Nishioka K, Kanazawa T, Ito K, Yamano Y, Nakamura H, Nakajima T, Nishioka K, The Japanese version of the 2010 American College of Rheumatology Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia and the Fibromyalgia Symptom Scale : reliability and

- validity, *Mod Rheumatol*, 20: 40-44, 2012, 査読有 (DOI: 10.1007/s10165-011-0462-3)
- ③ Sato T, Fujii R, Konomi K, Yagishita N, Aratani S, Araya N, Aono H, Yudoh K, Suzuki N, Beppu M, Yamano Y, Nishioka K, Nakajima T, Overexpression of SPACIA1/SAAL1, a new gene that is involved in synoviocyte proliferation, accelerates the progression of synovitis in mice and humans, *Arthritis Rheum*, 63: 3833-3842, 2011, 査読有 (DOI: 10.1002/art.30617)
- ④ Sato T, Konomi K, Fujii R, Aono H, Aratani S, Yagishita N, Araya N, Yudoh K, Beppu M, Yamano Y, Nishioka K, Nakajima T, Prostaglandin EP2 receptor signalling inhibits the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritic chondrocytes, *Ann Rheum Dis*, 70: 221-22, 2011, 査読有 (DOI: 10.1136/ard.2009.118620)
- ⑤ Araya N, Takahashi K, Sato T, Nakamura T, Sawa C, Hasegawa D, Ando H, Aratani S, Yagishita N, Fujii R, Oka H, Nishioka K, Nakajima T, Mori N, Yamano Y, Fucoidan therapy decreases the proviral load in patients with human T-lymphotropic virus typel-associated neurological disease, *Antivir Ther*, 16: 89-98, 2011, 査読有 (<http://www.intmedpress.com/serveFile.cfm?sUID=eda7bacc-605e-4dd6-b2aa-f62abc29e554>)
- ⑥ Omurzakova NA, Yamano Y, Saatova GM, Alybaeva MS, Nishioka K, Nakajima T, Prevalence of Group A  $\beta$ -Hemolytic *Streptococcus* Among Children with Tonsillopharyngitis in Kyrgyzstan: The Difficulty of Diagnostics and Therapy, *Open Rheumatol J*, 4: 39-46, 2010, 査読有 (DOI: 10.2174/1874312901004010039)
- ⑦ Bernasconi R, Galli C, Calanca V, Nakajima T, Molinari M.: Stringent requirement for HRD1, SEL1L, and OS-9/XTP3-B for disposal of ERAD-LS substrates, *J Cell Biol*, 188: 223-235, 2010, 査読有 (DOI: 10.1083/jcb.200910042)
- ⑧ Hasegawa D, Fujii R, Yagishita N, Matsumoto N, Aratani S, Izumi T, Azakami K, Nakazawa M, Fujita H, Sato T, Araya N, Koike J, Tadokoro M, Suzuki N, Nagata K, Senoo H, Friedman SL, Nishioka K, Yamano Y, Itoh F, Nakajima T, E3 ubiquitin ligase synoviolin is involved in liver fibrogenesis, *PLoS One*, 5: e13590, 2010, 査読有 (DOI: 10.1371/journal.pone.0013590)
- ⑨ Omurzakova NA, Yamano Y, Saatova GM, Shukurova SM, Mirzakhanova MI, Kydyralieva RB, Jumagulova AS, Mirrakhimov EM, Seisenbaev Ash, Nishioka K, Nakajima T, Rheumatologic services in Central Asian countries: current state of development of rheumatology in Central Asia. *Int J Rheum Dis*, 12: 288-292, 2009, 査読有 (DOI: 10.1111/j.1756-185X.2009.01442.x)
- ⑩ Maeda T, Marutani T, Zou K, Araki W, Tanabe C, Yagishita N, Yamano Y, Amano T, Michikawa M, Nakajima T, Komano H, An E3 ubiquitin ligase, Synoviolin, is involved in the degradation of immature nicastrin, and regulates the production of amyloid  $\beta$ -protein, *FEBS J* 276: 5832-5840, 2009, 査読有 (DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07264.x)
- ⑪ Araya N, Arimura H, Kawahara K, Yagishita N, Ishida J, Fujii R, Aratani S, Fujita H, Sato T, Yamano Y, Higuchi I, Osame M, Nishioka K, Fukamizu A, Arimura K, Maruyama I, Nakajima T. : Role of Kenae/CCDC125 in cell motility through the deregulation of RhoGTPase. *Int J Mol Med* 24, 605-611, 2009, 査読有 (DOI: 10.3892/ijmm\_00000271)
- ⑫ Azakami K, Sato T, Araya N, Utsunomiya A, Kubota R, Suzuki K, Hasegawa D, Izumi T, Fujita H, Aratani S, Fujii R, Yagishita N, Kamijuku H, Kanekura T, Seino K, Nishioka K, Nakajima T, Yamano Y, Severe loss of invariant NKT cells exhibiting anti-HTLV-1 activity in patients with HTLV-1-associated disorders, *Blood*, 114: 3208-3321, 2009, 査読有 (DOI: 10.1182/blood-2009-02-203042)
- ⑬ Yamano Y, Araya N, Sato T, Utsunomiya A, Azakami K, Hasegawa D, Izumi T, Fujita H, Aratani S, Yagishita N, Fujii R, Nishioka K, Jacobson S, Nakajima T, Abnormally high levels of virus-infected IFN- $\gamma$ + CCR4+ CD4+ CD25+ T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder, *PLoS One* 4:

- e6517, 2009, 査読有 (DOI: 10.1371/journal.pone.0006517)
- ⑭ Omurzakova NA, Yamano Y, Saatova GM, Mirzakhanova MI, Shukurova SM, Kydyralieva RB, Jumagulova AS, Seisenbaev Ash, Nishioka K, Nakajima T, High incidence of rheumatic fever and rheumatic heart disease in the republics of Central Asia. *Int J Rheum Dis*, 12: 79-83, 2009, 査読有 (DOI: 10.1111/j.1756-185X.2009.01388.x)
- ⑮ Izumi T, Fujii R, Izumi T, Nakazawa M, Yagishita N, Tsuchimochi K, Yamano Y, Sato T, Fujita H, Aratani S, Araya N, Azakami K, Hasegawa D, Kasaoka S, Tsuruta R, Yokouti M, Ijiri K, Beppu M, Maruyama I, Nishioka K, Maekawa T, Komiya S, Nakajima T, Activation of synoviolin promoter in rheumatoid synovial cells by a novel transcription complex of interleukin enhancer binding factor 3 and GA binding protein alpha, *Arthritis Rheum*, 60: 63-72, 2009, 査読有 (DOI: 10.1002/art.24178)
- ⑯ Omurzakova OA, Yamano Y, Sato T, Izumi T, Azakami K, Hasegawa D, Fujii R, Yagishita N, Aratani S, Kabaeva ZS, Mirrakhimov MM, Kami M, Maruyama I, Osame M, Yokota S, Nishioka K, Nakajima T, Increased prevalence of group A  $\beta$ -hemolytic streptococcus among an ethnic population in Kyrgyzstan detected by the rapid antigen detection test, *Molecular Medicine Reports* 1: 869-874, 2008, 査読有 (DOI: 10.3892/mmr\_00000043.)
- ⑰ Imaizumi T, Arikawa T, Sato T, Uesato R, Matsumiya T, Yoshida H, Ueno M, Yamasaki S, Nakajima T, Hirashima M, Sakata K, Ishibashi Y, Toh S, Ohyama C, Satoh K, Involvement of retinoic acid-inducible gene-I in inflammation of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes, *Clin Exp Immunol*, 153: 240-244, 2008, 査読有, (DOI: 10.1111/j.1365-2249.2008.03685.x)
- ⑱ Aratani S, Kageyama Y, Nakamura A, Fujita H, Fujii R, Nishioka K, Nakajima T, MLE activates transcription via the minimal transactivation domain in *Drosophila*, *Int J Mol Med*, 21: 469-476, 2008, 査読有 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18360693>)
- ⑲ Yagishita N, Yamasaki S, Nishioka K, Nakajima T, Synoviolin, protein folding and the maintenance of joint homeostasis, *Nature Clin Prac Rheum*, 4: 91-97, 2008, 査読有 (DOI: 10.1038/ncprheum0699)
- [学会発表] (計 40 件)
- ① Nakajima T, Locomotive syndrome meets metabolic syndrome. 1st Bio-Rheumatology International Congress (BRIC) Tokyo/the 8th GARN Meeting, Nov14-16, Tokyo, Japan (Hilton Tokyo Bay Hotel)
- ② Aratani S, Yagishita N, Kanazawa T, Nakajima F, Yamano Y, Nishioka K, Nakajima T, The functions of the post-translational modifications in rheumatoid arthritis. 1st Bio-Rheumatology International Congress (BRIC) Tokyo/The 8th GARN Meeting, Nov 15, Tokyo, Japan (Hilton Tokyo Bay Hotel)
- ③ Yagishita N, Hasegawa D, Aratani S, Yamano Y, Nakajima T, Importance of E3 ubiquitin ligase Synoviolin in fibrogenesis. 1stBio-Rheumatology International Congress (BRIC) Tokyo,/The 8th GARN Meeting, Nov 15, Tokyo, Japan (Hilton Tokyo Bay Hotel)
- ④ Yagishita N, Aratani S, Yamano Y, Nishioka K, Nakajima T, ER stress signaling as a chronicity of inflammation. 2nd Tokyo-Shanghai Rheumatology Workshop, Nov 13 2011, Tokyo, Japan (Hilton Tokyo Bay Hotel)
- ⑤ Yagishita N, Hasegawa D, Aratani S, Yamano Y, Nakajima T, Importance of E3 ubiquitin ligase Synoviolin in fibrogenesis, The 2011 ACR/ARHP Annual Scientific Meeting, Nov 8 2011, Chicago, U. S. A.
- ⑥ Aratani S, Yagishita N, Hasegawa D, Nishioka K, Nakajima T, Synoviolin ; a novel regulator for fibrosis. Ubiquitin Drug Discovery and Diagnostics 2011, 12 July 2011, Philadelphia, U. S. A.
- ⑦ Aratani S, Yagishita N, Hasegawa D, Nishioka K, Nakajima T, E3 ubiquitin ligase Synoviolin is involved in liver fibrogenesis. UbiquitinDrug Discovery andDiagnostics 2011, 12 July 2011, Philadelphia, U. S. A.

[その他]

ホームページ等

- ① 東京医科大学医学総合研究所  
運動器科学研究部門ホームページ  
<http://www.tokyo-med.ac.jp/rrc/>
- ② リウマチファンサイトホームページ  
<http://www.riumachi.org/>

報道関連

日経産業新聞  
2010年(平成22年)11月11日(木)  
11面  
「肝硬変、酵素たんぱく関与 東京医大など 確認 予防・治療薬開発に道」

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 利博 (NAKAJIMA TOSHIHIRO)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90260752

### (2) 研究分担者

山野 嘉久 (YAMANO YOSHIHISA)  
聖マリアンナ医科大学・難病治療研究センター・准教授  
研究者番号：80445882

八木下 尚子 (YAGISHITA NAOKO)  
聖マリアンナ医科大学・難病治療研究センター・講師  
研究者番号：40367389

上 昌広 (KAMI MASAHIRO)  
東京大学・医科学研究所・特任教授  
研究者番号：50422423

樋口 逸郎 (HIGUCHI ITURO)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授  
研究者番号：80183573

赤津 裕康 (AKATSU HIROYASU)  
医療法人さわらび会福祉村病院・長寿医学研究所・副所長  
研究者番号：00399734

川原 幸一 (KAWAHARA KOICHI)  
大阪工業大学・工学部・教授  
研究者番号：10381170

丸山 征郎 (MARUYAMA IKURO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：20082282

岡田秀親 (OKADA HIDECHIKA)  
医療法人さわらび会福祉村病院・長寿医学研究所・研究員  
研究者番号：30160683

荒谷聡子 (ARATANI SATOKO)  
東京医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40387064

(3) 連携研究者  
なし